Lane Medical Library

Aus der Kinderklinik der Universität Kiel.
Direktor: Prof. Dr. Rominger.

STANFORD UNIVERSITY MAY LIBRARY

Eine Milchsäurebestimmung des Liquor cerebrospinalis und ihre Bedeutung für die Klinik.

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Christian - Albrechts - Universität zu
KIEL

Vorgelegt von
Heinz August Schmidt
aus Nordenham.

KIEL 1930

Hansa-Druckerei, Kiel, Brunswiker Straße 5, gegenüber der Universität.

Nr. 25.

Rektoratsjahr 1930/31.

Referent: Prof, Dr. **Rominger.**

Zum Druck genehmigt:
Schröder
Dekan.

In der Klinischen Wochenschrift wurde vor kurzem von Fasold und Schmidt eine Arbeit über die Glykolyse im normalen und pathologischen Liquor veröffentlicht. Im Anschluß daran möchte ich jetzt die bei diesen Untersuchungen angewandte Bestimmungsmethode der Liquormilchsäure näher erläutern. Der Liquor cerebrospinalis hat besonders in den letzten Jahren hinsichtlich seiner diagnostischen und prognostischen Bedeutung sehr viel Beachtung gefunden. Während aber die weitaus meisten Autoren den Gehalt der Spinalflüssigkeit an Zucker, Eiweiß und Zellen untersuchten und für die Klinik auswerteten, ist ein nicht minder interessanter Anteil, die Milchsäure, kaum beachtet worden.

Die ersten Untersuchungen dieser Art wurden im Jahre 1896/97 von Cavazzani und Nawratski, die unbeständige reduzierende Substanzen im Liquor nachweisen konnten, vorgenommen. Mott fand im Jahre 1910 keine Abnahme der reduzierenden Substanzen in steril aufbewahrten Lumbalpunktaten. Diese beiden Ansichten stehen sich noch heute scharf gegenüber, ohne endgültig entschieden zu sein. Löwy und Nishimura forderten 1916 wiederum nach Cavazzanis Vorbild eine sofortige Liquoruntersuchung, da sonst eine Zunahme der Milchsäure auf Kosten des Zuckers stattfinden sollte. Einen sehr großen Fortschritt in dieser Frage brachte die Arbeit von Scheller, München 1925. Einem normalen Liquor schreibt er ebenso wie Wiechmann keine glykolytische Fähigkeit zu und begründet dies mit der Zellarmut des Punktates. Nach seiner Ansicht kommt in pathologischen Spinalflüssigkeiten besonders den Leukozyten eine glykolytische Fähigkeit zu. Nach den Untersuchungen von Wittgenstein und Gaedertz und weiterhin von Mendel und Goldscheider entspricht der Milchsäurespiegel des Liquors dem des Blutes. Aus kombinierten Milchsäure- und Zuckeruntersuchungen bei tuberkulöser Meningitis mit hoher Zellzahl konnten Mendel-Goldscheider einen sicheren Schluß auf die Langsamkeit des Stoffaustausches zwischen Liquor und Blut ziehen. In neuester Zeit sind besonders die Arbeiten von Chevassut und Nielsen von Bedeutung, die im scharfen Gegensatz zueinander stehen. Nach K. Chevassut beruht eine sofortig eintretende Glykolyse auf einem spezifisch wirkenden enzymatischen Prozeß, während Nielsen in einer längeren Untersuchungsreihe lediglich exogene Faktoren für eine eventuell stattfindende Milchsäurezunahme anschuldigen

konnte. Schon Scheller hatte nachgewiesen, daß der Liquorzucker in umgekehrtem Verhältnis zur Milchsäure steht. Daher kommt letzterem eine isolierte klinische Bedeutung nicht zu, sondern immer ist gleichzeitig der Zuckerwert zu bestimmen. Aus diesem Grunde wurden auch in der genannten Arbeit von Fasold und Schmidt die Milchsäure- und Zuckerwerte gleichzeitig untersucht. Der steril gewonnene und aufbewahrte Liquor wurde in bestimmten Zeitabständen untersucht, um so eine eventuelle Zunahme der Milchsäure feststellen zu können. Ich werde mich darauf beschränken, die Milchsäurebestimmungsmethode im folgenden zu erläutern, da jedes einschlägige Lehrbuch die bekannte Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jenner bringt.

Alle Untersuchungen des Liquors auf Milchsäure habe ich nach der ursprünglich von Embden-Frankfurt angegebenen und von Clausen modifizierten Methode ausgeführt. Vor dem eigentlichen Versuch mußte jedesmal das Enteiweißen und Entzuckern des Liquors vorgenommen werden, da besonders Clausen neben Brehme und Brahdy betonte, daß im Blut und ebenso im Liquor die Eiweißkörper und auch der Zucker sulfit bindende Substanzen bilden könnten, die demgemäß Milchsäure vortäuschen. Das Eiweiß wird nach der Methode von Folin-Wu durch zweidrittel Schwefelsäure und wolframsaures Natrium und der Zucker nach Slyke und Palmer mit Kupfersulfat und Kalziumhydroxyd entfernt. Diese beiden Vorgänge lassen sich sehr leicht vereinigen. Mit einer Ostwald'schen Pipette nimmt man 5 ccm des vollkommen steril gewonnenen Liquors und bringt sie in einen 100 ccm Kolben. Hierzu setzt man 35 ccm destilliertes Wasser, von dem man einen Teil zur nochmaligen Reinigung der Pipette benutzt. Dann bringt man 5 ccm einer 10 %igen wolframsauren Natriumlösung und 5 ccm einer $^2/_3$n Schwefelsäure in den Kolben, verschließt ihn mit einem Pfropfen und schüttelt das Gemisch. Die Prüfung mit Kongo- und Lackmuspapier soll eine neutrale oder schwachsaure Reaktion ergeben. Durch einen Faltentrichter filtriert man den ganzen Inhalt in ein Becherglas, so oft, bis eine völlig klare Lösung durchläuft. Von diesem Filtrat nimmt man 20 ccm und setzt 5 ccm einer gesättigten Kupfersulfatlösung und einen flachen Hornlöffel voll Kalziumhydroxyd hinzu. Dies Gemisch läßt man ungefähr eine halbe Stunde stehen, rührt es aber mehrere Male um. 10 Minuten zentrifugieren beenden die Prozesse des Enteiweißen und Entzuckerns. Es ergibt sich als Zentrifugat im allgemeinen eine vollkommen klare Flüßigkeit von 15 ccm, die vorsichtig mit einer Pipette zu entnehmen sind. Bevor ich jetzt zum Versuch selbst übergehe, bringe ich eine kurze Beschreibung der Anordnung der

Apparatur. Ein 500 ccm Kjeldahlkolben, in dessen Hals sich eine Kühlschlange befindet, ist durch ein einfaches Glasrohr, das doppelt rechtwinklig gebogen ist, mit einem 250 ccm Stehkolben verbunden. Auf diesem zweiten Kolben sitzt ein Saugturm der annähernd zur Hälfte mit Glasperlen gefüllt ist und in Verbindung mit einer Saugpumpe steht. Durch einen Tropftrichter gelangt die oxydierende Kaliumpermanganatlösung in den Kjeldahlkolben. Wird der Apparat in Betrieb gesetzt, so reißt der Luftstrom der Saugpumpe die oxydierten flüchtigen Substanzen aus dem Kjeldahlkolben in den Stehkolben und von hier in den Saugturm hinein. In dem Turm werden die Substanzen von der Absorptionsflüssigkeit des Stehkolbens, die beim laufenden Versuch die Glasperlen umspült, gebunden. Nach Ablauf der vorgeschriebenen Versuchszeit wird der Inhalt des Saugturmes abgelassen und untersucht.

Zur Bestimmung der Liquormilchsäure bringe ich die 15 ccm des Zentrifugates zusammen mit 10 ccm einer Schwefelsäure-Mangansulfatlösung, deren Herstellung und besondere Bedeutung weiter unten geschildert wird, in den Kjeldahlkolben und verdünne das Gemisch mit destilliertem Wasser auf etwa 110 ccm. Der Stehkolben wird anfangs lediglich mit ungefähr 100 ccm destilliertem Wasser gefüllt. Dann wird die Saugpumpe angestellt und der Kjeldahlkolben bis zum Sieden erhitzt. Durch ein kurzes Aufkochen von $^1/_2$ bis 1 Minute erreicht man, daß alle flüssigen Substanzen wie z. B. Azeton, die das Natriumbisulfit des Stehkolbens binden könnten und dadurch eine große Ungenauigkeit in den Versuch hineinbringen, entfernt werden. Da die Milchsäure selbst nicht flüchtig ist, kann bei diesem Vorversuch nichts von ihr verloren gehen. Dann unterbreche ich kurz das Erhitzen und tausche die Vorlage gegen eine andre aus, die 5 ccm einer 1 prozentigen Natriumbisulfitlösung enthält, das mit destilliertem Wasser auf 80 ccm verdünnt wurde. Die oxydierende Kaliumpermanganatlösung läßt man jetzt in solcher Menge durch das Trichterrohr in die zu untersuchende Lösung tropfen, daß sie farblos oder leicht fleischfarben gehalten wird. Die Oxydation der Milchsäure zu Azetaldehyd geht sehr schnell vonstatten, sodaß die im Augenblick des Zusatzes auftretende rötliche Farbe sofort wieder verschwindet, bis der Hauptteil der Milchsäure oxydiert ist, vorausgesetzt, daß die Kaliumpermanganatlösung nur langsam tropfend hinzugesetzt wird. Bei diesem oxydativem Vorgang setzt die nicht zu unterschätzende Wirkung der Schwefelsäuremangansulfatlösung ein. 285 ccm konz. Schwefelsäure werden mit 100 g Mangansulfat in destilliertes Wasser gelöst und auf 1000 ccm verdünnt. Diese Lösung ist besonders

nach zwei Richtungen hin für die Genauigkeit des Versuches von Bedeutung. Sie bewirkt eine schnellere und stärkere Oxydation der Milchsäure. Die Anwesenheit eines Ueberschusses von Mangansalz vor Beginn der Oxydation vermehrt den durch Permanganat oxydierten Betrag von Milchsäure und läßt die Reaktion schneller in Gang kommen. Anfangs würde bei Abwesenheit des Mangansalzes der Prozeß sehr langsam vor sich gehen, und bei erfolgter Reduktion des Kaliumpermanganates sehr viel stärker zu werden. Wird aber das Mangansalz vor oder mit dem Kaliumpermanganat zugesetzt, so beginnt die Oxydation der Milchsäure sofort. Es häuft sich in diesem Fall kein Ueberschuß von Permanganat gegen Ende der Oxydation an und die Gefahr einer weiteren Oxydation des Azetaldehydes ist vermindert. Als weiterer Schutz wird durch die Saugwirkung dann das eben entstandene Aldehyd aus der kochenden Flüssigkeit herausgerissen. Das Mangansalz hat bei dieser Versuchsanordnung eine selten günstige Wirkung. Es vermehrt die Oxydation und mäßigt daneben doch die Reaktion. Diese letztere Wirkung verdankt das Mangansalz dem bei dem Prozeß mit Kaliumpermanganat entstehenden Mangandioxyd. Durch Elektronenaustausch wird die Kaliumpermanganatlösung zu dem weniger wirksamen Faktor MnO_2, der wohl noch genügt, um die Milchsäure zu oxydieren, dabei aber nicht stark genug ist, das Azetaldehyd annähernd so schnell weiter abzubauen. Der zweite Vorteil, den Betrag des Aldehydes selbst zu vermehren, ist durch Analyse bewiesen worden. Unter sonst gleichen Umständen werden bei Zusatz von Schwefelsäuremangansulfatlösungen 5 bis 20 % mehr Azetaldehyd gewonnen. Obgleich nun, wie eben gezeigt wurde, das Mangansalz einen eventuell eintretenden Ueberschuß von Kaliumpermanganatlösung unschädlich macht, ist doch die Schnelligkeit des Tropfenfalles nach dem Maße des Verbrauches zu regulieren. Beginnt die Fleischfarbe langsamer zu verschwinden, so hält man für einige Augenblicke mit dem Zusatze des Oxydationsmittels an. Verschwindet die Farbe nicht auf die Dauer von einer Minute als Zeichen der ungebundenen Kaliumpermanganatlösung, so ist die Oxydation beendet, was im allgemeinen nach 10 Minnten eintreten sollte. Andernfalls muß weiter die Permanganatlösung zugesetzt werden bis der beschriebene Zeitpunkt eintritt. Darauf ist das Kochen noch 5 Minuten fortzusetzen, um die Reste des Aldehydes aus dem Kjeldahlkolben zu befreien. In seiner Gesamtheit nimmt der Versuch ungefähr 18 Minuten in Anspruch. Die Flamme wird entfernt, und die Saug- und Kühlleitung abgestellt. Der Stehkolben, der als Aufnahmeflasche dient, wird herabgenommen und nimmt die aus dem

Turm fließende Lösung auf. Der Saugturm ist dann zur besseren Reinigung mit 25 ccm destilliertem Wasser in Portionen zu 5 ccm auszuspülen. Nachdem die so gewonnene Menge mit dem Indikator Stärke versetzt ist, wird zuerst das überschüssige Natriumbisulfit durch Titrieren mit $^1/_{100}$ n Jodlösung entfernt. Ein Zuviel ist gegebenenfalls mit $^1/_{100}$ n Natriumthiosulfatlösung rückgängig zu machen. Dieser Zeitpunkt der Entfernung des Ueberschusses ist gezeichnet durch einen schwachblauen Schimmer, der mit einiger Uebung sehr genau und fein bestimmt werden kann. Hier ist eine sehr große Genauigkeit unbedingt erforderlich, da die jetzt folgende zweite Titration, die für den ganzen Versuch von ausschlaggebender Bedeutung ist, hiervon abhängt. Das für die Milchsäurebestimmung allein wesentliche an das Natriumbisulfit gebundene Azetaldehyd wird durch den Zusatz eines Löffels voll Natriumbikarbonates befreit und das gebundene Sulfit wird mit einer sehr genau herzustellenden $^1/_{500}$ n Jodlösung titriert, wobei wiederum genau auf den feinen blaugrauen Farbton zu achten ist, der nach Vorschlag von Brehme-Brahdy eine volle Minute bestehen bleiben muß. Bei dieser zweiten Titration soll man nach Angabe derselben Autoren den Stehkolben schütteln, da die Farbe anfangs dadurch noch zum Schwinden zu bringen ist. Vor einer Titration bei künstlicher Beleuchtung wird allgemein gewarnt, was ich nur bestätigen kann. Aus dem bei der letzten Titration gefundenen Wert an verbrauchter $^1/_{500}$ n Jodlösung bekommt man durch sehr einfache Rechnung die Prozentzahl der im Liquor vorhandenen Milchsäure. 1 ccm der Jodlösung entspricht 0,09 mg % Milchsäure. In den Kjeldahlkolben wurde 15 ccm der Liquorlösung gebracht, um diese Menge auf 1000 ccm umzurechnen, muß man 0,09 mit 1000/15 multiplizieren, um auf mg % zu kommen. Zusammengefaßt ergeben diese Zahlen eine Multiplikation mit 6.

Die angeführte Versuchsanordnung und der beschriebene Apparat haben besonders zwei Hauptvorzüge. Erstens wird das Volumen des Endproduktes, das ungefähr 110 ccm beträgt, für die nachfolgende Titration verhältnismäßig klein gehalten, da der Luftstrom, der durch das Trichterrohr eintritt, das Azetaldehyd in den Empfänger herüberreißt. Durch dieses Transportmittel wird jede zu destillierende Flüßigkeit entbehrlich, wie sie z. B. Embden in seiner ursprünglichen Versuchsanordnung anführt. Gleichzeitig erreicht man eine sehr große Zeitersparnis durch diese Luftstromdestillation, die den Versuch von 1 $^1/_2$ Stunde nach Embden auf 15 bis 18 Minuten abkürzt und eine vollkommenere Gewinnung des Azetaldehydes gewährleistet. Zweitens bewirkt man durch den Vorversuch eine günstig wirkende Trennung des ge-

wonnenen Azetaldehydes von anderen flüchtigen Substanzen, die zum Teil sehr ähnliche Eigenschaften haben aber nicht von der Milchsäure herstammen. Die Zahl der interferierenden Substanzen wird sehr reduziert und die Bestimmung noch spezifischer für die Milchsäure. Bei sehr langsamem Zusatz von Kaliumpermanganat wäre theoretisch die Anwesenheit eines Ueberschusses von Mangansalz zu entbehren.

Die Gegner der Clausen'schen Apparatur weisen besonders auf zwei Nachteile hin, durch die die Resultate eine zu große Höhe erreichen sollen. Sämtliche Flaschen sind mit Gummistöpseln verschlossen, bestehen also aus organischer Substanz, die mit Schwefelsäure z. B. Sulfit bindende Substanzen bilden könnten. Meiner Ansicht nach ist wegen der kleinen Angriffsfläche, der geringen Anzahl der wirklich in Betracht kommenden Pfropfen und wegen ihrer Lage dieser Umstand für die Resultate nicht von einer Bedeutung, die berücksichtigt werden müßte. Vielmehr Berechtigung hat dagegen der zweite Einwand. Von allen Autoren wird auf die Unreinheit der Transportluft hingewiesen, die ja zum kleinen Teil auch als Kühlluft dient. Von den empfohlenen Gegenmaßnahmen sind vor allen Dingen zwei zu nennen. Während der kleinere Teil der Autoren Luft aus dem Freien, die aber auch keine absolute Reinheit garantiert, als Transportmittel empfiehlt, wird von Clausen selbst sowie von Cotonia und Davenport, auf das Hilfsmittel des Kontrollversuches hingewiesen. An jedem Untersuchungstag habe ich mindestens einen Leerversuch angesetzt, den ich zwischen die übrigen einschaltete und nun für alle Werte die gefundene Kontrollzahl in Abzug brachte. Die Versuchsanordnung ist dabei dieselbe wie oben beschrieben, nur nimmt man statt des Liquors die gleiche Menge destilliertes Wasser. Mit dieser Nachprüfung gewinnt man ein Urteil über den Wert aller an diesem Prozesse beteiligten Reagentien und besonders über den Grad der Reinheit der Transportluft, die ja durch den ganzen Apparat gesaugt wird. Sind in der Luft irgendwelche Substanzen vorhanden, mit der Fähigkeit das Natriumbisulfit zu binden, so äußert sich dies beim zweiten Titrieren in einem positiven Ausfall. Als solche sulfitbindende Substanzen kommen vor allen Dingen Azeton, Zucker usw. in Frage, die natürlich aus dem Untersuchungsraum zu entfernen sind. Davenport führt ungefähr 50 solcher interferierender Substanzen an, von denen aber nur oben genannte praktische Bedeutung haben. Bei meinen eigenen Versuchen stellte sich das Resultat des Kontrollversuches nach ganz kurzem Schwanken auf den Wert von 2—3 mg % Milchsäure ein, den ich dann in Abzug brachte.

Aus unseren Milchsäurebestimmungen lassen sich folgende Schlüsse ziehen, die wenigstens zum Teil für die Klinik ausgewertet werden können. In keinem der Fälle, bei denen es sich um einen normalen Liquor handelte, war im Laufe von zwei Wochen eine nennenswerte Abnahme des Zuckers eingetreten. Auch war kein weiterer Abbau der Milchsäure zu bemerken. Von einer ausgesprochenen Glykolyse, wie z. B. Chevassut sie angibt, kann in diesen Fällen also nicht die Rede sein. In einem gewissen Gegensatz dazu stehen die Punktatuntersuchungen von Meningitiskranken mit hoher Zellzahl. Hier hatte zwar eine geringe Zunahme der Milchsäure stattgefunden, die aber wegen der langen Aufbewahrungszeit nicht als Ausdruck einer Glykolyse anzusehen ist. Vielmehr handelt es sich hier sehr wahrscheinlich um die abbauende Wirkung der bei dem Stehen durch Zellzerfall freigewordenen Fermente, zumal wir später bei einem zellfrei zentrifugierten pathologischen Liquor keine Glykolyse fanden. Für die Klinik ist die Milchsäurebestimmung des Liquors vor allem für die Diagnose und Prognose gewisser Erkrankungen des Gehirns und seiner Häute zu verwenden. Uebereinstimmend fanden alle Autoren in der mir zugänglichen Literatur z. B. eine Milchsäurezunahme bei Meningitiden, dagegen eine starke Zuckersteigerung bis 86 mg % bei Encephalitis. Für die Prognose mancher Fälle hat die Milchsäure und Zuckerbestimmung Bedeutung, wie ich in einem Fall von Meningokokken-Meningitis beobachten konnte. Schon 14 Tage vor dem Exitus hatte der Patient einen erhöhten Milchsäurespiegel im Liquor, der gegen das Ende hin eine langsame aber stete Erhöhung bis zu 92 mg % erfuhr. Erleichtert werden diese Untersuchungen durch die Erfahrung unserer Versuche, daß nämlich ein Stehenlassen eines steril gewonnenen Liquors auf die Dauer von 12 bis 24 Stunden keine nennenswerten Verschiebungen der Werte bewirkt.

Herrn Prof. Dr. Rominger erlaube ich mir, für die Förderung meiner Arbeit meinen gehorsamsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

A. Wittgenstein,	Bioch. Zeitschr., Bd. 187.
A. Wittgenstein,	Deutsch. Med. Wochenschr., Jg. 49.
J. Glaser,	Journ. of Biol. Chem., Bd. 69.
Wohlgemuth und Nakamura,	Bioch. Zeitschr., Bd. 175.
Brehme und Brahdy,	Bioch. Zeitschr., Jg. 1926.
Scheller,	Münchener Med. Wochenschr., Jg. 73.
K. Chevassut,	Quart. Journ. of Med., Bd. 21.
Löwy,	Zeitschr. f. Klin. Med., Bd. 83.
Cotonia und Davenport,	Journ. of Biol. a. Chem., Jg. 1928.
Schmitz,	Lehrbuch der physiol. Chemie, 1927.
Brugsch-Schittenhelm,	Klin. Laboratoriumstechnik. 1923.
Mader und Saenger,	Klin. Wochenschr., Jg. 4.
Mendel und Goldscheider,	Klin. Wochenschr., Jg. 4.
Matthes,	Lehrbuch der Differentialdiagnose innerer Krankheiten, 1928.
Nielsen,	Zeitschrift für die ges. experiment. Medizin, 1929.
Wittgenstein und Gaedertz,	Klin. Wochenschr., Jg. 6.

Lebenslauf.

Ich, Heinz August Schmidt, wurde als Sohn des Gutsbesitzers A. H. Schmidt und seiner Ehefrau Louise, geb. Dose, am 31. Januar 1905 zu Elsfleth in Oldenburg geboren. Vom Jahre 1915 bis 1925 besuchte ich die Oberrealschule zu Brake, die ich mit dem Reifezeugnis verließ. Im Sommersemester 1925 kam ich an die Universität Kiel, wo ich nach 5 Semestern mein Physikum bestand. Nachdem ich das Sommersemester 1927 in Wien studierte. kam ich im Wintersemester 1927/28 nach Kiel zurück, um hier mein Studium zu beenden.